

**Małgorzata KOWALCZYK, Monika ASZTEMBORSKA\***

Institut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk,  
01-224 Warszawa, ul. Kasprzaka 44/52  
e-mail: [masztemborska@ichf.edu.pl](mailto:masztemborska@ichf.edu.pl)\*

## **Sole sodowe kwasów cholowych jako chiralne modyfikatory fazy ruchomej w układzie wysokosprawnej chromatografii cieczowej**

Bile acid sodium salts as chiral modifiers of mobile phase in high performance liquid chromatography

**Streszczenie:** W pracy opisano zastosowanie cholanu sodu i deoksycholanu sodu, jako modyfikatorów fazy ruchomej w wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Własności enancjoseparacyjne micelarnych faz chiralnych dla optycznie czynnych pochodnych binaftyli: fosforanu- 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu oraz 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu. Zbadano proces adsorpcji cholanu i deoksycholanu sodu na fazie C18. Zbadano wpływ stężenia i typu surfaktantu, jak również rodzaj i stężenie dodatku organicznego (*n*-alkohol) na proces rozpoznania chiralnego przez badane układy micelarne.

**Słowa kluczowe:** pochodne binaftyli, rozdzielanie chiralne, cholan sodowy, deoksycholan sodowy, chiralne fazy ruchome, micelarna chromatografia cieczowa

**Abstract:** In the paper the application of sodium cholate and sodium deoxycholate as modifiers of mobile phase in high performance liquid chromatography was described. Enantioseparation properties of micellar chiral phases were studied for optically active derivatives of binaphthyls: 1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogenphosphate and 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol. The process of adsorption of sodium cholate and sodium deoxycholate on C18 phase was studied. The influence of type and concentration of surfactant as well as type and concentration of organic additive (*n*-alcohol) on process of chiral recognition was investigated. It has been found that enantio-recognition of bile salts micelle increase with the increase of the chain length of *n*-alcohol.

**Key words:** binaphthyl derivatives, chiral separation, sodium cholate, sodium deoxycholate, chiral mobile phases, micellar liquid chromatography

### **1. Wstęp (Introduction)**

Micelarna chromatografia cieczowa (ang. *Micellar Liquid Chromatography*, MLC) stanowi alternatywną technikę w stosunku do wysokosprawnej chromatografii cieczowej faz odwróconych (RP-HPLC). W przeciwieństwie do klasycznej techniki RP-HPLC wodno-organiczna faza ruchoma zastępuje jest wodnym roztworem surfaktantu o stężeniu powyżej krytycznego

punktu micelnego (CMC). Fazę stacjonarną stanowią, podobnie jak w układzie RP-HPLC, chemicznie związane z mikroporowatą krzemionką łańcuchy węglowe o różnej długości np. C2, C8, C18.

Zastosowanie miceli jako modyfikatorów fazy ruchomej po raz pierwszy zostało opisane w 1980 roku przez Armstronga i Henry'ego [1]. Autorzy wykorzystali z powodzeniem wodny roztwór SDS do rozdzielania mieszaniny fenoli i węglowodorów aromatycznych. Od tamtej pory nastąpił rozwój techniki co uwidacznia się we wzroście liczby publikacji oraz artykułów przeglądowych [wydanie specjalne *Journal of Chromatography A* 1997, vol. 780], w tym również pozycji książkowych [2, 3]. Obecnie w technice MLC wykorzystuje się wiele surfaktantów m.in. CTAB, Brij 35, Titron X-100, SDS.

W porównaniu z klasyczną metodą RP-HPLC modyfikacja fazy ruchomej i fazy stacjonarnej prowadzi do wzrostu różnorodności oddziaływań. W MLC mamy do czynienia z oddziaływaniami o charakterze elektrostatycznym, hydrofobowym oraz przestrzennym. Dzięki temu możliwe jest jednocześnie rozdzielanie mieszaniny cząsteczek naładowanych i obojętnych, jak również molekuł nierozpuszczalnych w roztworach wodnych.

Do najczęściej stosowanych chiralnych surfaktantów w metodzie MLC należą sole kwasów cholowych. Wzrost stężenia surfaktantu w fazie ruchomej powoduje wzrost lepkości fazy, co wymusza zastosowanie mniejszego przepływu fazy, a tym samym wydłuża czas analizy. W przypadku cholanów w zakresie stężeń 20-150 mM wzrost lepkości fazy jest niewielki, dzięki czemu możliwe jest stosowanie typowych przepływów charakterystycznych dla techniki HPLC [4]. Dodatkową zaletą cholanów jest ich transparentość w zakresie światła widzialnego, co ma to istotne znaczenie w doborze sposobu detekcji [5].

Podobnie jak dla liniowych surfaktantów achiralnych w przypadku cholanów zaobserwowano adsorpcje surfaktantu na powierzchni fazy stacjonarnej. Hinze [4] badając własności deoksycholenu sodu jako dodatku do fazy ruchomej, wyznaczył iż ilość zaadsorbowanego surfaktantu na jeden gram fazy C18 leży w zakresie 80-149 mg. Wyznaczona wielkość jest porównywalna z otrzymanymi przez Borgerdinga [6, 7] dla surfaktantów liniowych takich jak SDS, CTAB, Brij-35. Adsorpcja cholanów na fazie stacjonarnej jest procesem odwracalnym. Badając rozdzielanie mieszanin achiralnych związków hydrofobowych Hinze [4] zauważył, że dodatek rozpuszczalnika organicznego poprawia efektywność rozdzielania oraz symetryczność pików. Najlepsze wyniki uzyskał dla alkoholi o średniej długości łańcucha węglowego (butanol, pentanol). Wpływ dodatku organicznego na rozdzielanie chiralne w literaturze opisane jest bardzo skromnie. Brak jest całościowych danych opisujących efekt dodatku na proces rozpoznania chiralnego.

Obok rozdziałów mieszanin izomerów strukturalnych m.in. metyloindolu, witaminy D, na micelarnej fazie ruchomej z cholanem uzyskano również rozdziały stereoizomerów m.in. estriolu, Dns-DL-aminokwasów [4, 5] oraz pochodnych binaftyli [8]. Na podstawie przeprowadzonych analiz, wnioskuje się że układy micelarne soli kwasów cholowych wykazują największą zdolność rozpoznania chiralnego w stosunku do molekuł posiadających centra chiralne blisko głównych grup funkcyjnych np. pierścienia aromatycznego [9]

oraz cząsteczek o chiralności aksjalnej [5]. Szczególnie istotne jest to z punktu widzenia rozdzielania związków chiralnych o zahamowanej rotacji do których należą pochodne binaftyli. Powszechnie używane cyklodekstryny, ze względu na dość dużą pojemność luki, nie zawsze znajdują zastosowanie w enancjoseparacji tej klasy analitów i w tym aspekcie rozpoznania chiralnego sole kwasów cholowych mogą być ich doskonałym zamiennikiem.

Badania dotyczące zastosowania soli kwasów cholowych jako modyfikatorów fazy ruchomej zrealizowano w układzie wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej. Pionierskie badania w tym temacie wykonał Hinze w latach dziewięćdziesiątych [4, 5]. Opisane w literaturze dane są jednak niesystematyczne i niewystarczające do charakterystyki chiralnych cholowych faz ruchomych.

## **2. Część eksperymentalna (Experimental)**

### **Aparatura (Apparatus)**

Pomiary przeprowadzono na chromatografie cieczerwowej firmy Knauer (Berlin, Niemcy) wyposażonym w pompę Mini-Star K-501 oraz detektor ze zmienną długością fali UV K-2501. Dozownik wyposażony był w pętlę o objętości 1  $\mu$ l.

Kolumnę termostatowano w termostacie firmy Knauer (Berlin, Niemcy). Sygnał z detektora zbierano za pomocą programu EUROCHROM 2000 dostarczonego przez firmę Knauer (Berlin, Niemcy).

### **Charakterystyka kolumny (Column characteristic)**

Do badań stosowano komercyjną kolumnę Luna C18(2) o wymiarach 250 x 1.0 mm, rozmiar ziarna 5  $\mu$ m, firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA). Masa fazy stacjonarnej wynosiła 0,1143 g, powierzchnia właściwa fazy stacjonarnej wynosiła 400 m<sup>2</sup>/g, pokrycie fazy wynosiło 3,0  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>.

Przepływ fazy ruchomej był stały i wynosił 0.04 ml/min. Pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej.

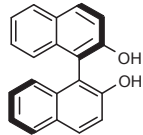
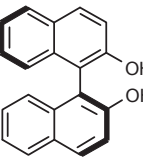
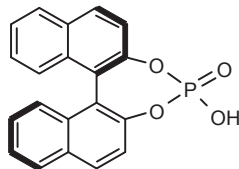
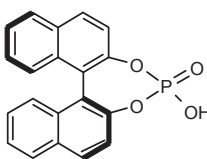
Zaadsorbowane na fazie stacjonarnej cholany desorbowano 80% wodnym roztworem metanolu. Czas przemywania wynosił średnio 8 h.

### **Odczynniki i substancje badane (Chemicals and studied compounds)**

Do rozdzielania stereoizomerów związków modelowych, jako eluenty stosowano wodne roztwory surfaktantów z dodatkiem rozpuszczalnika organicznego. N-butanol, n-heksanol i n-oktanol pochodziły z firmy POCH (Gliwice, Polska). N-pentanol i n-heptanol wyprodukowano w firmie BDH (Poole, Wielka Brytania). Metanol pochodził z firmy Lab-Scan (Dublin, Irlandia). Cholan sodowy, deoksycholan sodowy, (*R*)-(+)-1,1'-Binaftylo-2,2'-diol, (*S*)-(-)-1,1'-Binaftylo-2,2'-diol, (-)-Fosforan-(*R*) - 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu oraz (+)-Fos-

foran-(S) - 1,1'-binaftylo-2,2'-diylu pochodzący z firmy Fluka (Buchs, Szwajcaria). Wzory strukturalne badanych związków przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Wzory strukturalne badanych związków  
**Table 1.** Structural formulae of investigated compounds

Nazwa	Wzór strukturalny
(R)-(+)- 1,1'-Binaftylo-2,2'-diol	
(S)-(-)- 1,1'-Binaftylo-2,2'-diol	
(-)-Fosforan-(R) - 1,1'-binaftylo-2,2'-diylu	
(+)-Fosforan-(S) - 1,1'-binaftylo-2,2'-diylu	

Użyte odczynniki były o stopniu czystości cz.d.a. Substancje badane rozpuszczano w metanolu.

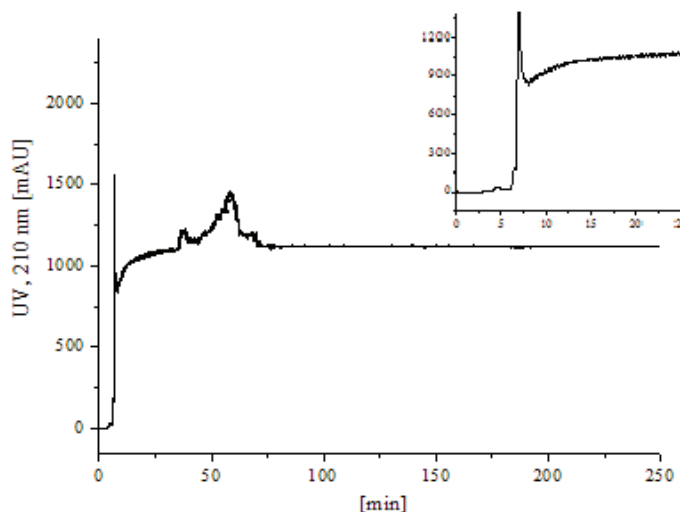
W celu wyznaczenia objętości wolnej kolumny stosowano metanолоwyy roztwór uracylu. Roztwory eluentów sączono przez filtry membranowe nylonowe o wielkości porów 0.45  $\mu\text{m}$  (Supelco, USA).

### 3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

#### Badanie adsorpcji cholanów na fazie stacjonarnej C18 (The study of adsorption of cholates on stationary phase C18)

Do głównych własności cząsteczek amfifilowych należą: możliwość tworzenia struktur micelarnych w roztworach wodnych oraz adsorpcja fizyczna molekuł na powierzchni międzyfazowej. Adsorpcja soli kwasów cholowych na fazach stacjonarnych jest ubogo opisana w literaturze. Informacja ta jest jednak niezbędna do przeprowadzenia planowanych eksperymentów. Jak wiadomo adsorpcja surfaktantów na fazach stacjonarnych w układzie RP, zależy nie tylko od typu amfifila, ale również od środowiska np. dodatków organicznych, temperatury.

Na rys. 1 zamieszczono otrzymaną krzywą przejścia dla 100 mM wodnego roztworu cholanu sodu (NaC). Czas retencji substancji niezatrzymanej na kolumnie wynosił 2.2 min.

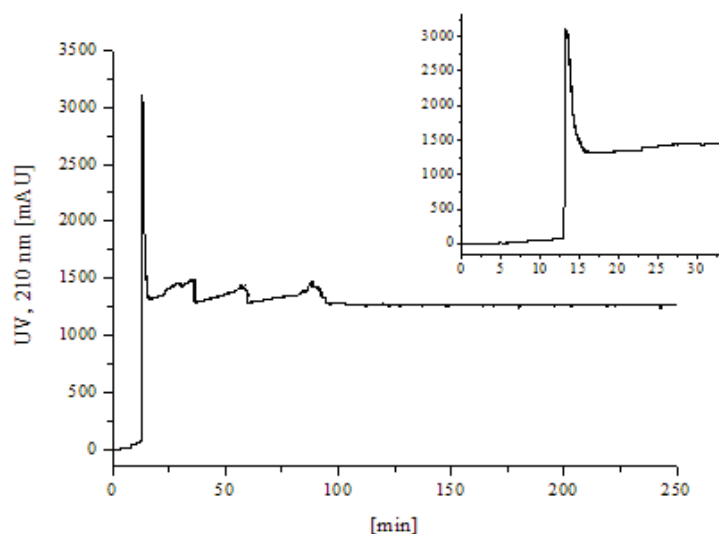


Rys. 1. Chromatograficzna krzywa przejścia dla wodnego roztworu 100 mM NaC; warunki: detekcja UV 210 nm, przepływ fazy ruchomej: 0.04 ml/min, temp: 25°C, kolumna: RP-18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 1. Chromatographic breakthrough curve for 100 mM NaC solution; conditions: detection UV 210 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C

Przedstawiona krzywa adsorpcji cholanu na fazie stacjonarnej jest podobna do otrzymanej przez Hu [10] dla zwitterjonowych surfaktantów o budowie planarnej (CHAPS, CHAPSO). W przebiegu krzywej zauważono trzy etapy. W pierwszym (0-4 min.), pomimo przejścia eluentu przez kolumnę, sygnał z detektora pozostał niezmienny. Sugeruje to, że cały surfaktant zawarty w fazie ruchomej uległ adsorpcji na fazie C18. Znając stężenie surfaktantu, przepływ fazy ruchomej oraz masę wypełnienia kolumny wyznaczono przybliżoną masę zaadsorbowanego surfaktantu w pierwszym etapie. Obliczona masa zaadsorbowanego surfaktantu na 1 g wypełnienia kolumny wynosiła ok. 58.6 mg. W drugim etapie (4-6.5 min) zaobserwowano wzrost wartości sygnału detektora (absorbancji), co sugeruje obecność cholanu sodu w fazie ruchomej. Wzrost ten jednak jest nieznaczny i świadczy o tym, że stan równowagi nie został osiągnięty i proces adsorpcji nadal postępuje. Po ok. 7 min na krzywej przejścia NaC zanotowano ostry pik. Wydaje się, że obserwowany nagły wzrost i spadek sygnału może wynikać z niehomogeniczności fazy ruchomej na wyjściu z kolumny. Po ok. 75 min absorbancja osiągnęła wartość stałą, równą absorbancji roztworu wejściowego. Dalsze przemywanie fazy stacjonarnej wodnym roztworem cholanu sodu nie wpłynęło na proces adsorpcji surfaktantu. Zakładając, iż adsorpcja surfaktantu następuje w pierwszym i drugim etapie, obliczona masa zaadsorbowanego cholanu sodu na 1 g wypełnienia kolumny LUNA C18(2) wynosiła 99.7 mg.

Analogiczną krzywą przejścia uzyskano dla wodnego roztworu deoksycholanu sodu (NaDC) (rys. 2).



Rys. 2. Chromatograficzna krzywa przejścia dla wodnego roztworu 100 mM NaDC; warunki: detekcja UV 210 nm, przepływ fazy ruchomej: 0.04 ml/min, temp: 25°C, kolumna: RP-18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 2. Chromatographic breakthrough curve for 100mM NaDC solution; conditions: detection UV 210 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C

Czas retencji substancji niezatrzymywanej na kolumnie wynosił 2.2 min. W przypadku roztworu NaDC obliczona masa surfaktantu, osadzona na fazie C18 w pierwszym (ok. 114 mg/g) oraz drugim etapie przemywania, jest dwukrotnie wyższa (ok. 185 mg/g) niż dla roztworu bardziej polarnego NaC. Po ok. 105 min, sygnał detektora osiągnął wartość stałą, co świadczy o ustaleniu się stanu równowagi procesu adsorpcja/desorpcja. Otrzymane wielkości zaadsorbowanego NaDC pozostają w zgodzie z wynikami otrzymanymi przez Hinze [4]. Wyznaczona przez autorów ilość zaadsorbowanego surfaktantu NaDC na jeden gram fazy C18, w zależności od składu fazy ruchomej oraz temperatury, leżała w zakresie 80-149 mg. Otrzymane wyższe wartości adsorpcji mogą wynikać z dwóch czynników: innej struktury ziaren złoża oraz uproszczonej idei obliczeniowej (założono, że obsadzenie w pierwszym i drugim etapie przebiega w 100%).

Obok krzywych przejścia z roztworów wodnych NaC oraz NaDC, zarejestrowano również przykładowe zależności dla roztworów z dodatkiem 1% v/v rozpuszczalnika organicznego w różnych stężeniach surfaktantu. Należy podkreślić, że w przypadku metanolu i propanolu, użyte stężenie modyfikatora było poniżej jego rozpuszczalności ( $S$ ) w wodzie, zaś dla alkoholu długocząsteczkowego n-heptanolu powyżej  $S$  ( $H_2O$ ) (tabela 2).

**Tabela 2.** Rozpuszczalność wybranych alkoholi w wodzie

**Table 2.** Solubility of selected alcohols in water

	MeOH	n-PeOH	n-HepOH
S ( $H_2O$ ) [g/100g]	$\infty$	2,4	0,1

Zarówno zmiana stężenia amfifila jak i dodatek modyfikatora organicznego nie wpłynęły na zmianę profilu krzywej. Tabela 3 zawiera uzyskane wyniki adsorpcji.

Otrzymane dane pozostają w zgodności z opublikowanymi przez Berthod'a [11] dla surfaktantów liniowych, sugerując zależność procesu adsorpcja/desorpcja od dodanego n-alkoholu. Zgodnie z przewidywaniem w badanym układzie dodatek rozpuszczalnika organicznego zredukował ilość zaadsorbowanego surfaktantu na fazie stacjonarnej. Większe obsadzenie deoksycholaniem sodu fazy stacjonarnej uzyskano dla roztworów z dodatkiem 1% metanolu niż 1% n-pentanolu. Adsorpcja alkanolu oraz surfaktantu na fazie C18 są procesami konkurencyjnymi. Alkohol o długim łańcuchu węglowym jest silnie adsorbowany na fazie stacjonarnej, przez to może zmieniać organizację łańcuchów C18 i ograniczać adsorpcję surfaktantu. Alkohole krótkołańcuchowe (C1-C3) wykazują jedynie tendencję do zwilżania fazy stacjonarnej, bez zmiany orientacji łańcuchów C18 [12]. Ze względu na małe stężenie dodatku organicznego w fazie, efekt solwatacji cząsteczki surfaktantu może być pominięty.

**Tabela 3.** Wpływ stężenia surfaktantu na proces adsorpcji na fazie stacjonarnej C18

**Table 3.** The influence of surfactant concentration on adsorption process on stationary phase C18

Faza ruchoma	Masa zaadsorbowanego surfaktantu na 1 g wypełnienia kolumny [mg]
<b>Cholan sodu</b>	
0,08 M + 4% v/v PeOH	91,9
0,09 M+ 4% v/v PeOH	91,0
0.1 M	99,7
<b>Deoksycholan sodu</b>	
0,07 M+ 3% v/v MeOH	182,8
0,08 M+ 3% v/v MeOH	182,8
0,09 M+ 3% v/v MeOH	182,0
0.1 M	185,5
0,1 M + 1% v/v HepOH	182,0
0,1 M + 1% v/v PeOH	166,2
0,1 M + 3% v/v MeOH	178,5

Ciekawy rezultat otrzymano dla 1% n-heptanolu w układzie 100 mM deoksycholanu sodu. W tym przypadku ilość zaadsorbowanego NaDC jest niewiele mniejsza niż dla niemodyfikowanego wodnego roztworu surfaktantu. Sugeruje to, że dla stężenia powyżej  $S(H_2O)$ , alkohol długołańcuchowy wnika do wnętrza miceli, przez co tylko nieliczne molekuly n-heptanolu obecne są w fazie objętościowej roztworu (czego nie można powiedzieć o alkoholach C1-C5). Dysocjacja układu zagregowanego, prowadzi do obsadzenia fazy C18 monomerami surfaktantu, które z kolei na skutek samoorganizacji mogą tworzyć na powierzchni fazy agregaty zewnętrzne. W przy-

padku roztworu NaDC z dodatkiem n-heptanolu, ilość zaadsorbowanego alkoholu nie wpłynęła w znaczący sposób na obsadzenie fazy C18 surfaktantem (znaczną przewagę wolnych cząsteczek amfifila w stosunku do wolnych molekuł modyfikatora organicznego).

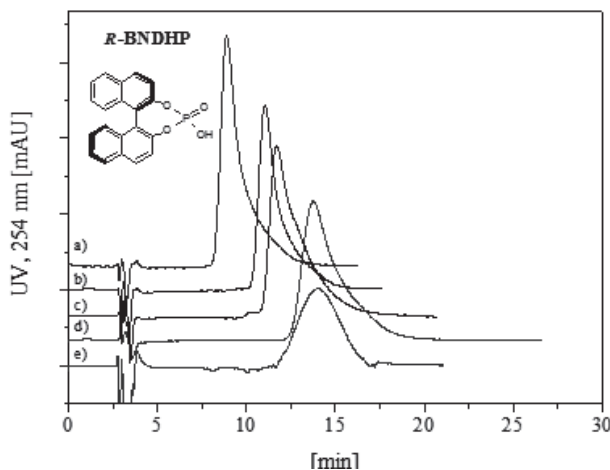
W pomiarach stężeniowych nie zaobserwowano znaczących różnic w ilości zaadsorbowanego NaC lub NaDC na fazie stacjonarnej (tabela 3). Potwierdza to założenie, że wybrany do badań zakres stężeń cholanów znajduje się powyżej punktu CMC, a zatem w roztworze obecne są zagregowane układy surfaktantu.

Z fazy stacjonarnej cholany desorbowano za pomocą 80% roztworu MeOH. Całkowitą desorpcję warstwy obserwowano po czasie ok. 120 min.

Powyższe dane wykorzystano jakościowo do planowania warunków prowadzenia kolejnych eksperymentów. Na podstawie uzyskanych informacji ustalono optymalny czas przemywania micelną fazą ruchomą złoża kolumny, potrzebny do nasycenia fazy stacjonarnej monomerami surfaktantu (4 h).

### Wpływ długości łańcucha alkilowego n-alkoholu na enancjoselektywność badanych układów cholanowych (*The influence of n-alcohol alkyl chain length on enantioselectivity of studied cholate systems*)

Związkami modelowymi w badaniach własności enancjoseparacyjnych cholanowych faz ruchomych były atropoizomery fosforanu- 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BNDHP) oraz 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BN). Badania prowadzono w temperaturze 25°C. W warunkach przeprowadzanych eksperymentów (pH 7.8-8.1) molekuły BN występowały jako cząsteczki obojętne ( $pK_{a1}=9.04$ ,  $pK_{a2}=10.90$  [13]), zaś izomery BNDHP były całkowicie zjonizowane ( $pK_a$  bliskie 1.12 [14]). Wyznaczone podstawowe parametry chromatograficzne: współczynnik retencji ( $k$ ), współczynnik rozdzielnia ( $\alpha$ ), rozdzielczość pików ( $R_s$ ) posłużyły do opisu procesu enancjoseparacji badanych układów surfaktantów.



Rys. 3. Chromatogramy (*R*)-BNDHP otrzymane w układzie 0.1 M NaC 1% (v/v) dodatkiem n-OctOH (a), n-HepOH (b), n-HexOH (c), n-PeOH (d), oraz bez dodatku rozpuszczalnika organicznego (e); warunki: przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 3. Chromatograms of (*R*)-BNDHP obtained in systems 0.1 M NaC 1% (v/v) with addition of n-OctOH (a), n-HepOH (b), n-HexOH (c), n-PeOH (d), and without addition of organic solvent (e); conditions: flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.



Na rys. 3 przedstawiono przykłady zarejestrowanych chromatogramów dla izomeru (*R*)- fosforanu- 1,1'-binaftylo-2,2'-diylu w układzie 0.1 M roztworu cholanu sodu z 1% v/v dodatkiem n-alkoholu.

Z przytoczonych przykładów wynika, że czasy retencji uzyskane dla *R*- BNDHP na cholanowej fazie ruchomej z 1% dodatkiem n-HexOH, n-HepOH oraz n-OctOH są dużo krótsze niż w roztworze niemodyfikowanym. Analogiczną tendencję redukcji czasów retencji otrzymano dla pozostałych izomerów cząsteczek modelowych. Zakładając potrójny model oddziaływań zaproponowany przez Armstronga [15], sugeruje to przesunięcie stałej równowagi procesu w kierunku micelarnej fazy ruchomej. Duże powinowactwo molekuł BN oraz BNDHP do węglowodorowej fazy stacjonarnej uniemożliwiło rejestrację chromatogramów bez dodatku amfifila w fazie ruchomej (zbyt długi czas retencji nawet w 40% roztworze MeOH). Uzyskane wyniki miały służyć jako wartości odniesienia dla analogicznych układów z dodatkiem amfifila w formie zagregowanej (dla układów >50% MeOH obserwowano proces deagregacji).

W celu porównania wpływu dodatku n-alkoholu na proces enancjoseparacji wyznaczono współczynniki retencji  $k$ , współczynniki rozdzielienia  $\alpha$  oraz rozdzielczości pików  $R_s$  dla modelowych cząsteczek izomerów. Wyznaczone wartości przedstawiono w tabeli 4. Na niemodyfikowanym alkoholem roztworze NaC uzyskane wartości  $k$  są dużo niższe dla izomerów BNDHP niż BN. Efekt ten najprawdopodobniej wynika z różnic w budowie i właściwościach fizykochemicznych obu molekuł. W przeciwieństwie do BN, BNDHP jest molekułą bardziej sztywną i w badanych warunkach obdarzoną ładunkiem ujemnym. Prawdopodobnym wydaje się zatem, że niższy współczynnik retencji uzyskany dla molekuł BNDHP wynika z efektu elektrostatycznego odpychania z fazą stacjonarną pokrytą anionowym surfaktantem. W przypadku obojętnej molekuły BN, brak jest oddziaływań o charakterze elektrostatycznym.

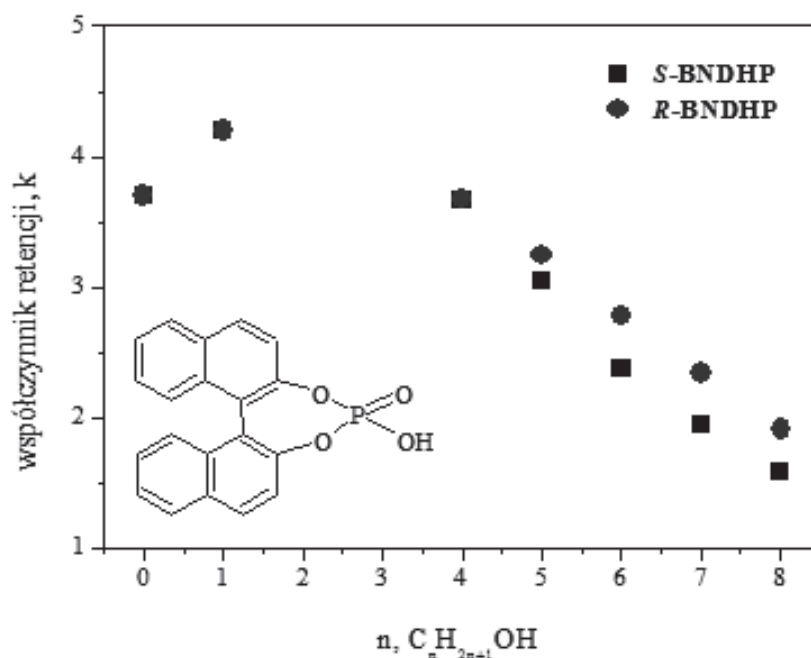
**Tabela 4.** Wpływ rozpuszczalnika organicznego (1% v/v) na współczynniki retencji  $k$ , zdolność rozdzielczą  $R_s$  oraz współczynnik rozdzielienia  $\alpha$  dla izomerów BNDHP oraz BN; warunki: 0.1 M NaC, przepływ 0.04 ml/min, detekcja UV 254 nm, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

**Table 4.** Influence of organic solvent (1% v/v) on retention factor  $k$ , resolution factor  $R_s$  and separation factor  $\alpha$  for isomers BNDHP and BN; conditions: 0.1 M NaC, flow rate 0.04ml/min, detection UV 254 nm, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

0.1 M NaC	BNDHP				BN			
	$k_R$	$k_S$	$\alpha$	$R_s$	$k_R$	$k_S$	$\alpha$	$R_s$
H <sub>2</sub> O	3,70	3,70	1,00	0,00	52,95	37,59	1,41	1,60
MeOH	4,20	4,20	1,00	0,00	59,88	42,73	1,40	1,54
n-BuOH	3,67	3,67	1,00	0,00	38,02	28,03	1,36	1,70
n-PeOH	3,22	3,03	1,06	0,17	26,27	21,75	1,21	1,45
n-HexOH	2,78	2,37	1,17	0,33	13,41	12,16	1,10	0,53
n-HepOH	2,34	1,94	1,21	0,52	13,19	12,05	1,10	0,37
n-OctOH	1,91	1,58	1,21	0,44	14,79	13,12	1,13	0,56

Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że zarówno dla molekuł BNDHP jak i BN w układzie 1% MeOH następował wzrost współczynników retencji w stosunku do roztworu odniesienia. Efekt ten można tłumaczyć wzrostem powinowactwa badanych molekuł do fazy stacjonarnej. Cząsteczki MeOH występują głównie w fazie objętościowej roztworu i wpływają na zmianę polarności oraz siły jonowej roztworu. W stosunku do fazy stacjonarnej wykazują jedynie tendencję do zwilżania. Niemniej jednak nie można wykluczyć ich wpływu na ułożenie zaadsorbowanego surfaktantu na fazie stacjonarnej tzw. architekturę fazy stacjonarnej.

Analiza wyników dla pozostałych badanych alkanoli wykazała, że wydłużenie łańcucha węglowego w cząsteczce modyfikatora wpływało na spadek wartości  $k$  dla badanych cząsteczek modelowych. W przypadku izomerów BNDHP obserwowana redukcja współczynników retencji dla  $n$ -alkoholi C5-C8 ma charakter liniowy (rys. 4). Największy spadek uzyskano na fazie ruchomej z dodatkiem 1% v/v oktanolu.

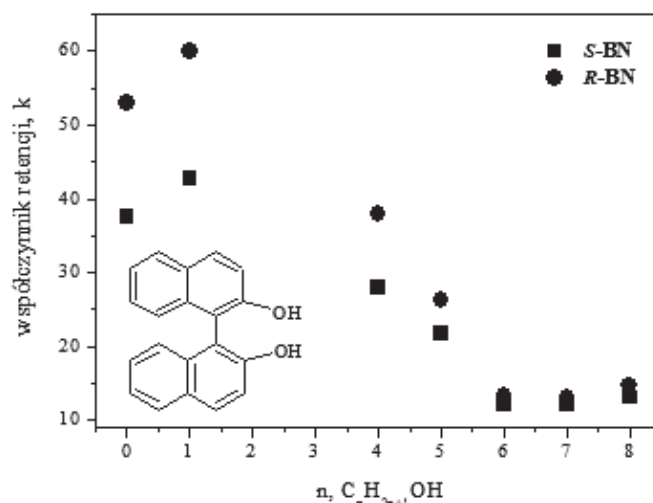


Rys. 4. Zależność współczynników retencji dla izomerów BNDHP w funkcji liczby atomów węgla w łańcuchu alkilowym  $n$ -alkoholu (1% v/v) w układzie cholanu sodu (NaC)

Fig. 4. The relation of retention factor for isomers of BNDHP versus the number of carbon atoms in the alkyl chain of  $n$ -alcohol (1% v/v) for sodium cholate system (NaC)

Na niemodyfikowanym układzie 0.1 M NaC dla izomerów BNDHP nie zaobserwowano rozróżnienia chiralnego. Separację atropoizomerów BNDHP uzyskano dopiero na fazach z 1% dodatkiem alkoholu o liczbie atomów węgla powyżej 4. Bez względu na rodzaj modyfikatora, jako pierwszy z kolumny eluowany był izomer o konfiguracji  $S$ . Ponadto zauważono, że im dłuższy łańcuch węglowy  $n$ -alkoholu, tym większa jest zdolność rozdzielcza pików. Spadek wartości  $R_s$  dla fazy z dodatkiem oktanolu wynika ze wzrostu asymetryczności pików.

Dla atropoizomerów obojętnego 1,1'-binaftylo-2,2'-diolu (BN) (rys. 5), zaobserwowano, że na eluentach z dodatkiem n-alkoholu C6-C8,  $k$  osiąga wartość w przybliżeniu stałą. Wraz z redukcją współczynników retencji dla izomerów BN, zaobserwowano spadek zdolności rozdzielczej układu. Wyznaczona zależność jest odwrotna w porównaniu do uzyskanej dla cząsteczek BNDHP. W tym przypadku przesunięcie równowagi procesu w kierunku micelarniej fazy ruchomej zmniejsza enecjoselektywność układu w stosunku do badanych molekuł. Podobnie jak dla atropoizomerów BNDHP silniej z micelami NaC oddziaływał izomer o konfiguracji S.



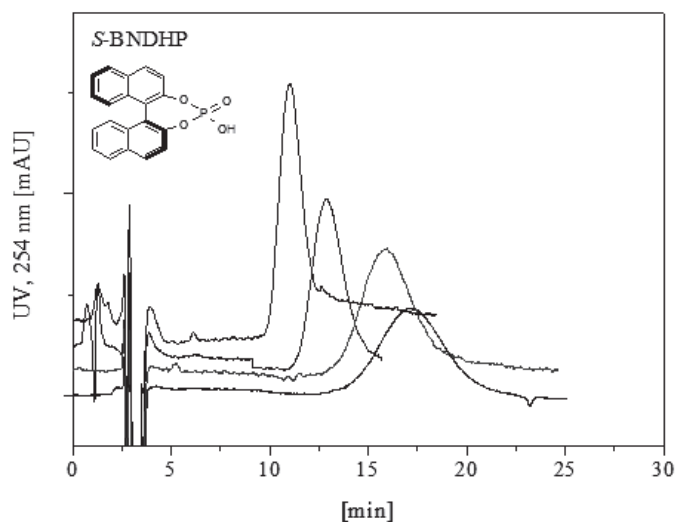
Rys. 5. Zależność współczynników retencji dla izomerów BN w funkcji liczby atomów węgla w łańcuchu alkilowym n-alkoholu (1% v/v) w układzie cholanu sodu (NaC)

Fig. 5. The relation of retention factor for isomers of BN versus the number of carbon atoms in the alkyl chain of n-alkohol (1% v/v) for sodium cholate system (NaC)

Zakładając możliwość oddziaływania analitu z układem zagregowanym w fazie ruchomej (oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe, oddziaływania o charakterze hydrofobowym), wielkość spadku współczynników retencji jest miarą oddziaływania pomiędzy surfaktantem a substancją badaną. Im większy spadek wartości  $k$ , tym silniejsze oddziaływanie pomiędzy surfaktantem w fazie ruchomej a analitem. Cząsteczki alkoholu modyfikują zarówno powierzchnię fazy stacjonarnej jak i micelle w fazie ruchomej. Ze względu na taki sam ładunek na cząsteczkach BNDHP i NaC, wzmocnienie procesu rozpoznania chiralnego połączone ze spadkiem wartości  $k$  tłumaczyć można wzrostem oddziaływań stereoselektywnych między analitem a chiralnym układem micelarnym w fazie ruchomej, zmodyfikowanym cząsteczkami rozpuszczalnika organicznego. Im dłuższy alkohol tym większe jego powinowactwo do miceli i prawdopodobnie większa modyfikacja struktury układu zagregowanego. Ponadto należy pamiętać o procesie oddziaływania rozpuszczalnika z molekułami zaadsorbowanego surfaktantu. Przesunięcie równowagi procesu w kierunku micelarniej fazy ruchomej wynikać może ze wzrostu polarności fazy stacjonarnej, będącym wynikiem sorpcji alkanolu na modyfikowanej surfaktantem fazie. Dla wszystkich badanych

cząsteczek modelowych obserwowane były znaczne spadki współczynników retencji. Silniejszym zatem wydaje się być oddziaływanie pomiędzy analitem a micelą niż analitem a fazą stacjonarną. W zależności jednak od budowy analitu oddziaływanie charakteryzowała różna enancjoselektywność. Oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami BN a modyfikowaną alkanolem micelą NaC było dużo mniej stereosektywne niż w przypadku izomerów BNDHP. Wzrost długości łańcucha węglowego dodatku wpływał bowiem na spadek zdolności rozdzielczej układu. Sugeruje to, że w przypadku izomerów BN w procesie enancjoseparacji atropoizomerów szczególną rolę odgrywa faza stacjonarna. Ograniczenie powierzchni kontaktu z cholanową fazą stałą zmniejszało zdolność rozpoznania chiralnego układu.

W celu porównania dwóch soli kwasów cholowych analogiczne pomiary przeprowadzono dla układu 0.1 M deoksycholenu sodu (NaDC). Na rys. 6 przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane dla izomeru S-BNDHP na badanych układach NaDC. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność oktanolu w wodnym roztworze deoksycholenu sodu pomiarów nie przeprowadzono dla eluentu o składzie 1% v/v OctOH / 0.1 M NaDC.



Rys. 6. Chromatogramy (S)-BNDHP otrzymane w układzie 0.1 M NaDC z 1% (v/v) n-HexOH (a), n-PeOH (b), BuOH (c) oraz bez dodatku rozpuszczalnika organicznego (d); warunki: przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 6. Chromatograms of (S)-BNDHP obtained in systems 0.1 M NaDC with 1% (v/v), n-HexOH (a), n-PeOH (b), BuOH (c) and without addition of organic solvent (d); conditions: flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Podobnie jak dla przedstawionego izomeru S-BNDHP, również dla pozostałych cząsteczek modelowych zaobserwowano skrócenie czasów retencji wraz ze wzrostem łańcucha alkilowego w cząsteczce modyfikatora organicznego. W tabeli 5 umieszczono wyznaczone wartości współczynników retencji  $k$ , współczynników rozdzielania  $\alpha$  oraz rozdzielczości pików  $R_s$  dla badanych związków.

**Tabela 5.** Wpływ rozpuszczalnika organicznego (1% v/v) na współczynniki retencji  $k$ , zdolność rozdzielczą  $R_s$  oraz współczynnik rozdzielienia  $\alpha$  dla izomerów BNDHP oraz BN; warunki: 0.1 M NaDC, przepływ 0.04 ml/min, detekcja UV 254 nm, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

**Table 5.** The influence of organic solvent (1% v/v) on retention factor  $k$ , resolution factor  $R_s$  and separation factor  $\alpha$  for isomers BNDHP and BN; conditions: 0.1 M NaDC, flow rate 0.04 ml/min, detection UV 254 nm, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

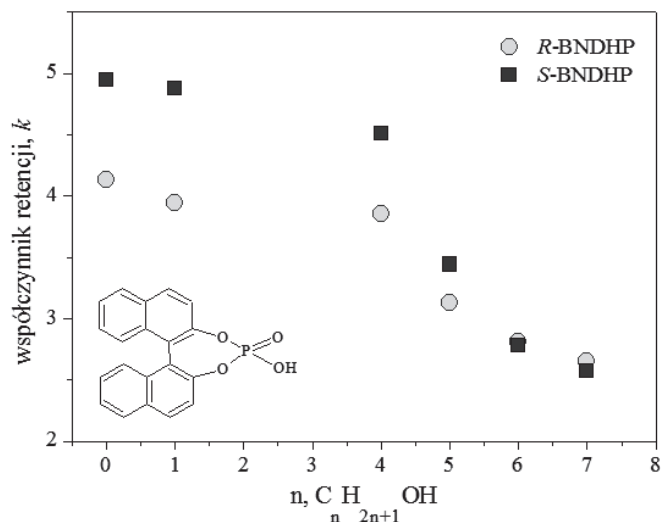
0.1 M NaDC	BNDHP				BN			
	$k_R$	$k_S$	$\alpha$	$R_s$	$k_R$	$k_S$	$\alpha$	$R_s$
H <sub>2</sub> O	4.13	4.95	1.20	0.18	23.00	21.18	1.11	0.21
MeOH	3.94	4.88	1.24	0.20	22.65	20.94	1.08	0.20
n-BuOH	3.85	4.51	1.17	0.16	21.48	19.93	1.08	0.16
n-PeOH	3.13	3.44	1.10	0.12	17.36	15.80	1.09	0.17
n-HexOH	2.80	2.79	1.00	0.00	12.22	11.38	1.07	0.12
n-HepOH	2.65	2.57	1.04	0.00	10.68	10.07	1.06	0.00

Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że dodatek organiczny obniżał  $k$  dla wszystkich cząsteczek modelowych w stosunku do eluentu odniesienia (100% H<sub>2</sub>O/NaDC). Im dłuższy łańcuch alkilowy w molekuie rozpuszczalnika, tym niższe wartości współczynników retencji dla cząsteczek modelowych. Dla izomerów BNDHP wielkości uzyskanych współczynników retencji były porównywalne z otrzymanymi w układzie cholanu sodu. W przypadku natomiast atropoizomerów BN wartości  $k$  uzyskane na niemodyfikowanym roztworze NaDC, są prawie dwukrotnie niższe niż dla analogicznej fazy z NaC (tabela 4). Sugeruje to większe powinowactwo molekuł BN do mniej polarnych miceli NaDC niż NaC obecnych w fazie ruchomej.

Na rysunkach 7 i 8 przedstawiono otrzymane zależności  $k$  w funkcji długości łańcucha węglowego alkoholu odpowiednio dla izomerów BNDHP oraz BN w układzie soli kwasu deoksycholowego. Obie krzywe charakteryzuje podobny przebieg. Dla alkoholi krótkołańcuchowych (C $\leq$ 4) redukcja  $k$  w stosunku do układu odniesienia jest niewielka. Znaczący spadek  $k$  zauważono dla faz z dodatkiem alkoholu o C $\geq$ 5. Największą redukcję wartości  $k$  odnotowano na fazie ruchomej z dodatkiem n-heptanolu.

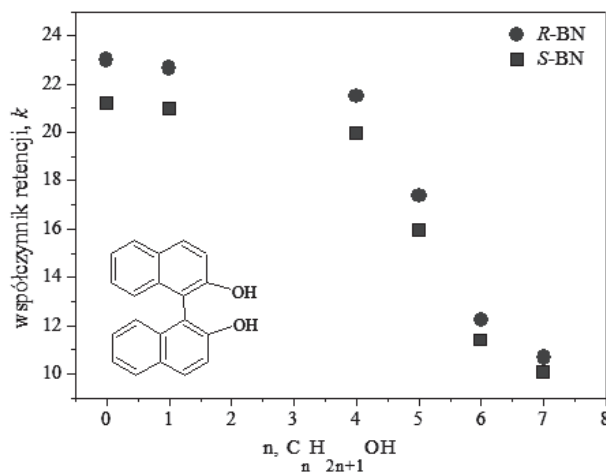
Wyznaczone spadki współczynników retencji są mniejsze w stosunku do uzyskanych na analogicznej fazie z NaC. Wydaje się zatem, że wpływ rozpuszczalnika na proces oddziaływania analitu z micelami NaDC jest słabszy. Niemniej jednak dodatek rozpuszczalnika organicznego przesunął równowagę procesu w kierunku micelarnej fazy ruchomej. Oddziaływanie analitu ze zmodyfikowanymi cząsteczkami rozpuszczalnika micelami NaDC charakteryzowała jednak niska stereoselektywność. Wraz z wydłużeniem łańcucha alkilowego n-alkoholu odnotowano spadek współczynników selektywności oraz rozdzielczości pików dla obu badanych par izomerów w układzie NaDC. Najlepsze wyniki enancjoseparacji uzyskano w niemodyfikowa-

nym układzie NaDC. Jako pierwszy z pary atropoizomerów BNDHP oraz BN eluowany był odpowiednio izomer *R*-BNDHP oraz *S*-BN. W stosunku zatem do fazy ruchomej z NaC, zaobserwowano odwrócenie kolejności wymywalnych izomerów BNDHP. Świadczy to o silniejszym powinowactwie izomeru *R*-BNDHP do miceli NaDC.



Rys. 7. Zależność współczynników retencji dla izomerów BNDHP w funkcji liczby atomów węgla w łańcuchu alkilowym n-alkoholu w układzie deoksycholatu sodu

Fig. 7. The relation of retention factor for isomers of BNDHP versus the number of carbon atoms in the alkyl chain of n-alkohol (1% v/v) for sodium deoxycholate system (NaDC)



Rys. 8. Zależność współczynników retencji dla izomerów BN w funkcji liczby atomów węgla w łańcuchu alkilowym n-alkoholu w układzie deoksycholatu sodu

Fig. 8. The relation of retention factor for isomers of BN versus the number of carbon atoms in the alkyl chain of n-alkohol (1% v/v) for sodium deoxycholate system (NaDC)

Ciekawie przedstawiał się przypadek separacji izomerów BNDHP w układzie NaDC. W tym przypadku wydłużenie łańcucha węglowego w dodatku organicznym wpłynęło na zmianę enancjoselektywności układu. Na

fazach z 1% dodatkiem alkoholi C1-C5 jako pierwszy eluował izomer o konfiguracji R. Dla 1% dodatku n-heksanolu (C6) obserwowano koelucję atropoizomerów BNDHP. Zamiana modyfikatora na 1% v/v n-heptanol (C7) wpłynęła natomiast na zamianę kolejności wymywania izomerów. W tym przypadku izomer S-BNDHP miał niższy współczynnik retencji i wymywany był jako pierwszy z pary R/S.

Ze względu na małą sprawność układu, zdolności rozdzielcze pików były bardzo niskie (tabela 5). W badanych warunkach nie udało się zarejestrować chromatogramów z rozdzielonymi pikami mieszaniny izomerów. Zarówno dla pary atropoizomerów BN oraz BNDHP, zdolność rozdzielcza pików nie osiągnęła wartości większej niż 0.2. Wyższe wartości współczynników rozdzielania uzyskano dla izomerów BNDHP. Porównując zdolność rozróżnienia chiralnego cholanu i deoksycholanu sodu w stosunku do cząsteczek modelowych w temperaturze 25°C, lepsze wyniki uzyskano w układzie z cholaniem sodu.

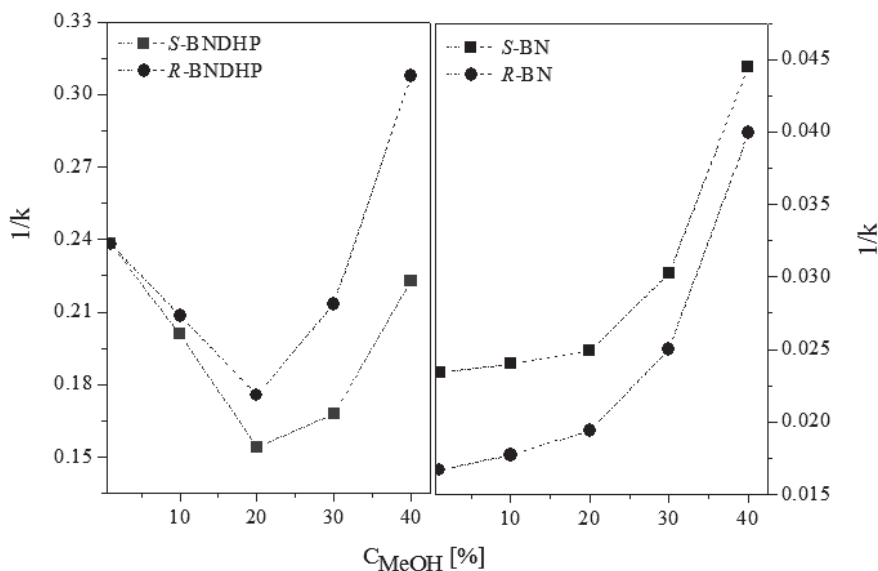
### **Wpływ stężenia modyfikatora organicznego na proces rozróżnienia chiralnego w badanych układach cholanowych** *(The influence of concentration of organic modifier on chiral recognition process in studied cholate systems)*

Do badań wpływu stężenia modyfikatora organicznego na proces enancjoseparacji atropoizomerów w układzie NaC (100 mM) oraz NaDC (100 mM), wybrano dwa alkohole: metanol (MeOH) i n-pentanol (PeOH). Cząsteczkę metanolu wybrano ze względu na nieograniczoną rozpuszczalność w roztworze wodnym oraz fakt, że w roztworze micelarnym znajduje się w objętościowej fazie roztworu.

W przeciwieństwie do metanolu, n-pentanol należy do alkoholi o ograniczonej rozpuszczalności w wodzie, które wbudowują się w strukturę miceli. Uzyskane wcześniej wyniki w układach NaC oraz NaDC z 1% v/v MeOH lub 1% v/v n-PeOH, wykazały zdolność rozróżnienia chiralnego w stosunku do badanych cząsteczek modelowych.

Na rys. 9 przedstawiono zależność odwrotności współczynników retencji w funkcji stężenia metanolu ( $C_{\text{MeOH}\%}$ ) dla izomerów BNDHP oraz BN w układzie cholanu sodu. Wpływ MeOH na retencję obu par izomerów jest różny. Dla cząsteczek BNDHP zaobserwowano nietypowy przebieg zależności. W zakresie stężeń MeOH 1-20%, wraz ze wzrostem stężenia dodatku w fazie micelarnej obserwowano wzrost współczynników retencji. Molekuły analitu były chętniej zatrzymywane na fazie stacjonarnej niż transportowane przez micelle NaC w fazie ruchomej modyfikowanej cząsteczkami MeOH. Powyżej stężenia 20% MeOH zaobserwowano odwrócenie tendencji. Efektu tego nie zaobserwowano dla molekuł BN. Dla atropoizomerów BN w całym zakresie badanego stężenia MeOH (1-40%) obserwowano spadek współczynników retencji wraz ze wzrostem stężenia modyfikatora w fazie ruchomej. Podobnie jak dla izomerów BNDHP, wykres  $1/k$  vs stężenie MeOH w zakresie 1-20% opisać można zależnością liniową, o dodatnim nachyleniu dla izomerów BN i ujemnym dla izomerów BNDHP. Odstępstwo od liniowo-

ści na fazach o wyższej zawartości metanolu sugeruje zmianę mechanizmu retencji procesu. Najprawdopodobniej na skutek wzrostu siły jonowej eluentu oraz częściowej deagregacji układu micelnarnego (wzrost CMC, spadek stężenia miceli w fazie), równowaga procesu przesunięta została w kierunku metanolowej fazy objętościowej.



Rys. 9. Wpływ stężenia MeOH na odwrotność współczynnika retencji dla związków modelowych w układzie 0.1 M NaC; warunki: detekcja UV 254 nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

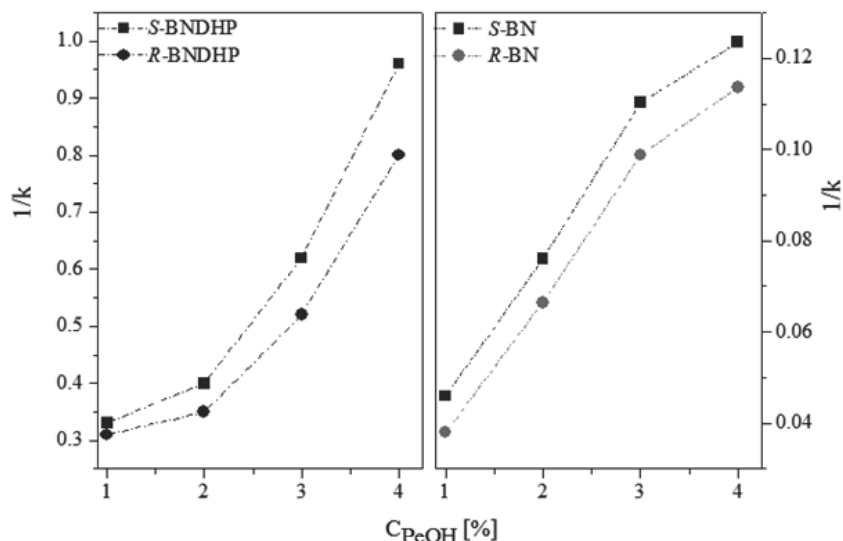
Fig. 9. The influence of MeOH concentration on the reversal of retention factor of model compounds in 0.1 M NaC system; conditions: detection UV 254 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Niezależnie od stężenia metanolu w badanym układzie, jako pierwszy z pary izomerów BNDHP oraz BN wymywany był odpowiednio izomer *R* oraz izomer *S*. W przypadku pary izomerów BNDHP wzrost stężenia metanolu generował i wzmacniał proces enancjoseparacji. Obserwowano wzrost rozdzielczości pików. Odwrotny efekt zauważono dla molekuł BN. W tym przypadku wzrost stężenia MeOH wpływał na skrócenie czasów retencji, pogorszenie współczynnika rozdzielania oraz spadek rozdzielczości pików.

Na rys. 10 graficznie przedstawiono uzyskane wyniki dla atropoizomerów BNDHP oraz BN w układzie 0.1 M NaC/n-PeOH. W tym przypadku dla obu par izomerów zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia n-PeOH następował spadek współczynników retencji. Jako pierwszy z pary izomerów wymywany był *S*-BNDHP oraz *S*-BN. W stosunku zatem do fazy z dodatkiem MeOH nastąpiła zmiana kolejności wymywanych atropoizomerów BNDHP. Dla izomerów BNDHP otrzymana zależność  $1/k$  vs  $C_{PeOH\%}$  w całym zakresie badanego stężenia PeOH odbiega od liniowości. Świadczy to o złożonym, nieliniowym wpływie modyfikatora na proces oddziaływania pomiędzy surfaktantem a analitem. W przypadku izomerów BN dla stężeń pentanolu w zakresie jego rozpuszczalności w wodzie ( $\leq 3\%$ ), otrzymano za-



leżność w przybliżeniu liniową. Dla stężenia powyżej rozpuszczalności w wodzie (4%), zaobserwowano odstępstwo od liniowości. Najprawdopodobniej ma to związek z modyfikacją układu micelnarnego przez łańcuchy alkilowe alkoholu, a tym samym zmianą stałej równowagi procesu oddziaływania pomiędzy analitem a micelą.

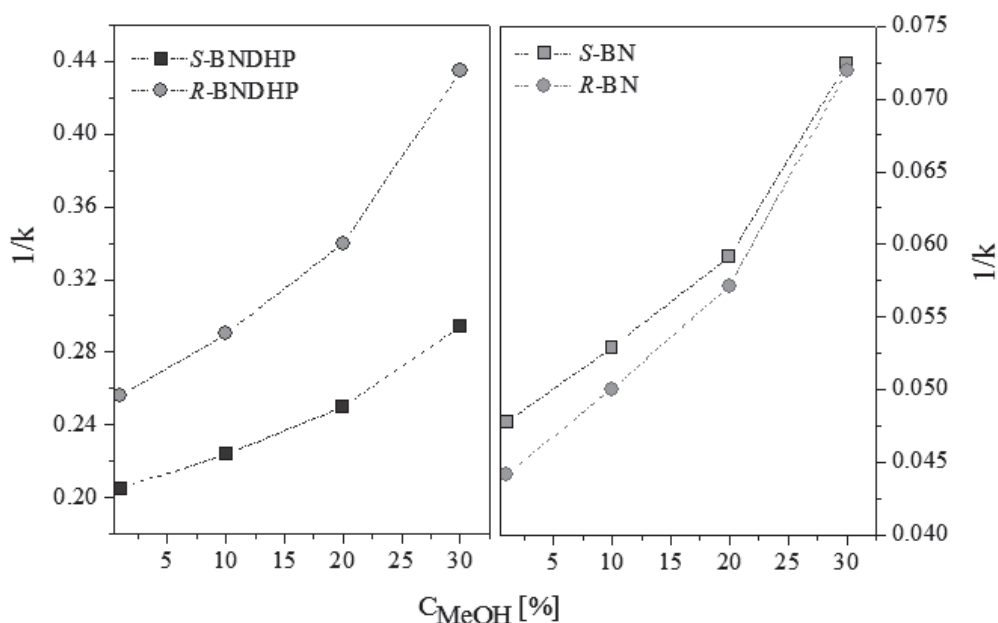


Rys. 10. Wpływ stężenia PeOH na odwrótność współczynnika retencji dla związków modelowych w układzie 0.1 M NaC; warunki: detekcja UV 254 nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu\text{m}$ ) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 10. The influence of PeOH concentration on the reversal of retention factor of model compounds in 0.1 M NaC system; conditions: detection UV 254 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu\text{m}$ ) 250 x 1.0 mm i.d.

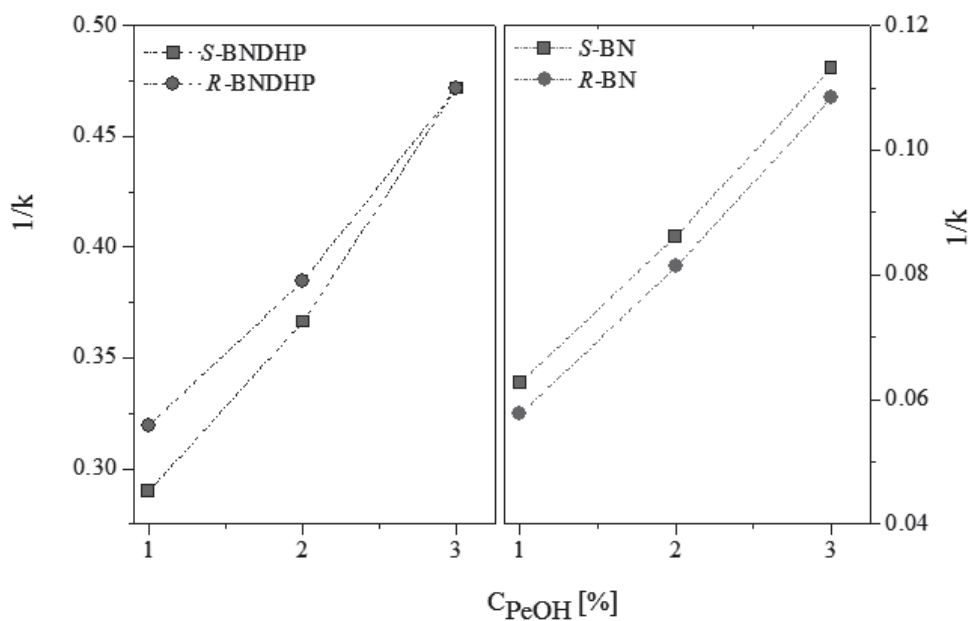
Wpływ cząsteczek PeOH na proces enancjoseparacji dla par izomerów BNDHP oraz BN jest podobny jak w przypadku MeOH. Wzrost stężenia PeOH w fazie ruchomej poprawiał współczynnik rozdzielania dla izomerów BNDHP i pogarszał dla izomerów BN. Mała wartość  $R_s$  dla izomerów BNDHP na fazie z dodatkiem 4% v/v PeOH wynikała ze wzrostu asymetrii pików.

Wpływ stężenia MeOH oraz PeOH na proces rozdzielania izomerów BN i BNDHP w układzie 0.1 M deoksycholenu sodu (NaDC) przedstawiono na rys. 11 i 12. Bez względu na rodzaj modyfikatora zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia alkoholu w fazie ruchomej spada wartość współczynnika retencji badanych izomerów. W żadnym z badanych układów nie odnotowano wzrostu wartości współczynnika retencji dla izomerów BNDHP. Podobnie jak dla cholanowej fazy ruchomej, w zakresie stężeń MeOH 1-20%, zaobserwowano liniową zależność  $1/k$  vs.  $C_{\text{MeOH}\%}$ . 30% dodatek MeOH wpływał na nieliniowy spadek współczynnika retencji BN i BNDHP w badanym układzie deoksycholenu sodu. Efekt ten widoczny był również na fazach z NaC i najprawdopodobniej wynika ze wzrostu siły jonowej eluentu i przesunięcia równowagi w kierunku fazy wodno-organicznej.



Rys. 11. Wpływ stężenia MeOH na odwrotność współczynnika retencji dla związków modelowych w układzie 0.1 M NaDC; warunki: detekcja UV 254 nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 11. The influence of MeOH concentration on the reversal of retention factor of model compounds in 0.1 M NaDC system; conditions: detection UV 254 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.



Rys. 12. Wpływ stężenia PeOH na odwrotność współczynnika retencji dla związków modelowych w układzie 0.1 M NaDC; warunki: detekcja UV 254 nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 12. The influence of PeOH concentration on the reversal of retention factor of model compounds in 0.1 M NaDC system; conditions: detection UV 254 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Deoksycholanowa faza ruchoma modyfikowana cząsteczkami MeOH wykazywała znaczną enancjoselektywność w stosunku do izomerów BND-HP. Wartości współczynników rozdzielania były wyższe niż na analogicznych fazach z cholanem sodu. Gorsze wyniki rozdzielania uzyskano natomiast dla izomerów BN. Podobnie jak w układzie cholanu sodu, wzrost stężenia MeOH wzmacniał proces enancjoseparacji dla izomerów BNDHP i osłabiał dla cząsteczek BN.

Układ z NaDC modyfikowany cząsteczkami PeOH wykazywał dużo gorszą zdolność rozpoznania chiralnego w stosunku do analogicznych faz z NaC. Zwiększenie stężenia PeOH w fazie ruchomej wpływało na spadek enancjoselektywności układu w stosunku do izomerów BN jak i BNDHP. W badanym zakresie stężeń PeOH (1-3%) zarówno dla izomerów BNDHP jak i BN zaobserwowano liniową zależność odwrotności współczynników retencji  $1/k$  w funkcji stężenia PeOH w fazie ruchomej.

Bez względu na rodzaj modyfikatora organicznego w układzie deoksycholanu sodu jako pierwszy z pary izomerów BNDHP wymywany był izomer o konfiguracji *R*, natomiast z pary BN atropoizomer o konfiguracji *S*.

### **Wpływ stężenia cholanu sodu i deoksycholanu sodu na chromatograficzne zachowanie się izomerów związków modelowych (*The influence of sodium cholate and sodium deoxycholate on chromatographic behaviour of model compounds isomers*)**

Aby określić charakter oddziaływania pomiędzy analitem a badanym układem micelnym cholanu sodu (NaC) lub deoksycholanu sodu (NaDC) przeprowadzono pomiary stężeniowe. W tym celu wykonano serię faz ruchomych o stężeniach surfaktantów: 0.1 M, 0.09 M, 0.08 M oraz 0.07 M. Użyte micelarne fazy ruchome wzbogacono o 3% dodatek rozpuszczalnika organicznego. Modyfikatorem faz z NaC był pentanol, zaś faz z NaDC metanol. Stężenie i rodzaj dodatku dobrane były w ten sposób, aby badane układy surfaktantów wykazywały enancjoselektywność w stosunku do cząsteczek modelowych oraz aby sam dodatek nie wpływał na budowę miceli w fazie ruchomej.

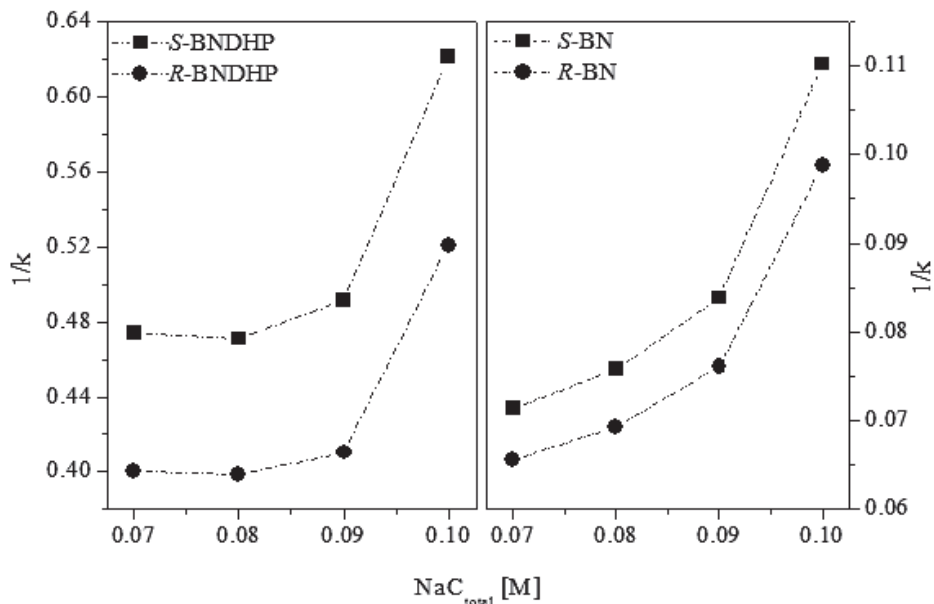
Otrzymane parametry chromatograficzne dla cząsteczek modelowych przedstawiono w tabeli 6. Na podstawie zestawionych wyników zauważono, że wraz ze wzrostem stężenia NaC w fazie ruchomej dla izomerów BN obserwowano spadki wartości współczynników retencji i wzrost enancjoselektywności układu. Dla izomerów BNDHP w zakresie stężeń 0.07 – 0.09 M nie zaobserwowano znaczących różnic w wartościach wyznaczonych współczynników retencji. Na fazie z 0.1 M NaC zaobserwowano natomiast ok. 20% spadek *k*. Na rys. 13 przedstawiono zależności odwrotności współczynników retencji dla izomerów BNDHP oraz BN w funkcji całkowitego stężenia NaC. W badanym zakresie stężeń prezentowane zależności nie są liniowe. Nieliniowość mogła wynikać z procesu reorganizacji układu micelnego (m.in. zmiany rozmiaru i/lub kształtu miceli). Zmiany te nie miały jednak znaczącego wpływu na zdolność rozpoznania chiralnego przez układ. Wraz ze wzrostem stężenia NaC dla izomerów BN zaobserwowano bowiem nieznaczny wzrost współczynników rozdzielania  $\alpha$  oraz zdolności rozdzielczej pików  $R_s$ . Dla izomerów BNDHP w badanym zakresie

stężeń  $\alpha$  pozostała niezmienną, a  $R_s$  nieznacznie wzrósł. Zmniejszenie rozdzielczości pików na fazie 0.1 M NaC związane było ze wzrostem asymetryczności pików.

**Tabela 6.** Wpływ stężenia cholanu sodu oraz deoksycholanu sodu na parametry chromatograficzne; warunki: detekcja UV 254 nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

**Table 6.** The influence of sodium cholate and sodium deoxycholate concentration on chromatographic parameters; conditions: UV detection 254 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

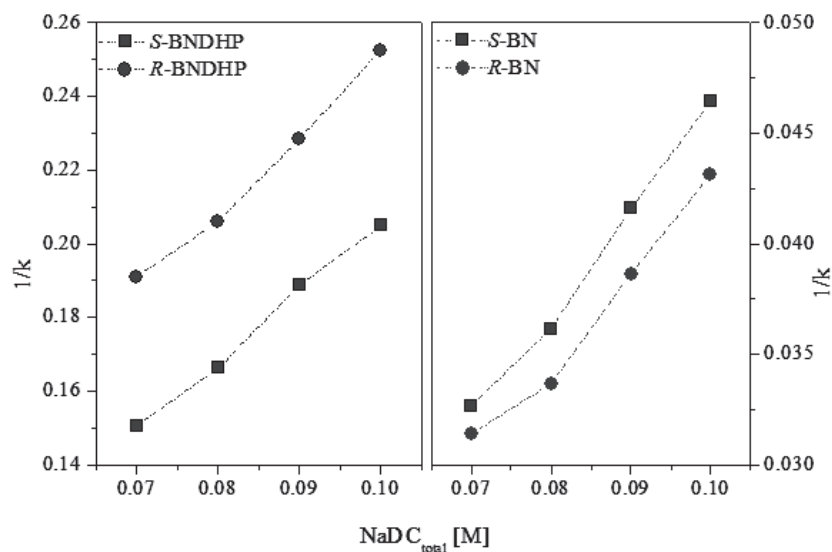
	BNDHP				BN			
	$k_R$	$k_S$	$\alpha$	$R_s$	$k_R$	$k_S$	$\alpha$	$R_s$
<i>NaC+ 3% v/v PeOH</i>								
0,07 M	2,49	2,11	1,18	0,67	15,24	14,00	1,08	0,64
0,08 M	2,5	2,12	1,18	0,69	14,42	13,19	1,09	0,69
0,09 M	2,43	2,03	1,19	0,70	13,13	11,92	1,10	0,73
0,10 M	1,92	1,61	1,19	0,49	10,12	9,07	1,11	0,70
<i>NaDC+ 3% v/v MeOH</i>								
0,07 M	5,35	6,78	1,26	0,40	31,85	30,59	1,04	0,15
0,08 M	4,85	6,02	1,24	0,30	29,69	27,67	1,07	0,15
0,09 M	4,37	5,30	1,21	0,20	25,88	24,03	1,07	0,19
0,10 M	3,96	4,88	1,23	0,20	23,17	21,53	1,07	0,17



Rys. 13. Zależność odwrotności współczynników retencji od stężenia cholanu sodu dla izomerów BNDHP oraz BN; warunki: detekcja UV 254 nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 13. The relation of reversal of retention factor versus sodium cholate concentration for isomers of BNDHP and BN; conditions: detection UV 254 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Wyniki uzyskane w układzie deoksycholany sodu są podobne do otrzymanych na fazach z NaC (tabela 6). Wzrost stężenia deoksycholany sodu wpłynął na redukcję współczynników retencji związków modelowych. W przeciwieństwie do fazy z NaC, spadek obserwowany jest w całym zakresie badanych stężeń NaDC zarówno dla izomerów BN jak i BNDHP. Wzrost stężenia NaDC nie wpłynął w znaczący sposób na enancjoselektywność układu. Na rys. 14 przedstawiono zależności  $1/k$  w funkcji całkowitego stężenia deoksycholany sodu. W porównaniu z zależnościami otrzymanymi w układzie z NaC dla BN oraz BNDHP, zaobserwowano zmianę przebiegu zależności. Odwrotność współczynników retencji jest liniową funkcją stężenia deoksycholany sodu o dodatnim stopniu nachylenia prostej.



Rys. 14. Zależność odwrotności współczynników retencji od stężenia deoksycholany sodu dla izomerów BNDHP oraz BN; warunki: detekcja UV 254 nm, przepływ 0.04 ml/min, temp. 25°C, kolumna C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Fig. 14. The relation of reversal of retention factor versus sodium deoxycholate concentration for isomers of BNDHP and BN; conditions: detection UV 254 nm, flow rate 0.04 ml/min, temp. 25°C, column C18 (5  $\mu$ m) 250 x 1.0 mm i.d.

Armstrong i Stine [16] badając oddziaływanie analitu z układem micelnym w zależności od sposobu wiązania, zaproponowali podział substancji na trzy klasy: (i) wiążące z micelami, (ii) nie oddziałujące z układem zagregowanym oraz (iii) wypychane z układu micelnego. Zgodnie z równaniem 4.8 dla substancji wiązanej przez micelle, nachylenie prostej przyjmuje wartość dodatnią ( $K_{WM} > 0$ ), zaś dla wypychanej z układu micelnego wartość ujemną ( $K_{WM} < 0$ ). Anality dla których wzrost stężenia surfaktantu nie wpływa na zmianę współczynników retencji ( $K_{WM} = 0$ ) nie oddziałują z układem micelnym. Powyższe rozważania odnoszą się do liniowych zależności stężeniowych. Analogiczne rozważania przeprowadzić można dla zależności kwadratowych. Zgodnie z powyższą klasyfikacją izomery BNDHP oraz BN należą do molekuł oddziałujących z układem micelnym cholany sodu oraz deoksycholany sodu. Dla wszystkich bowiem badanych molekuł otrzymane zależności  $1/k$  vs.  $C_{surfaktantu}$  w całym zakresie badanych stężeń mają nachy-

lenie dodatnie. Ciekawie przedstawia się zależność dla izomerów BNDHP w układzie cholanu sodu. Dla stężeń NaC z zakresu 0.07-0.09 M, współczynniki retencji izomerów BNDHP tylko nieznacznie różnią się między sobą. Mogłoby to sugerować, że ujemnie naładowane molekuly BNDHP nie oddziałują z micelami. Należy jednak pamiętać, że faza C18 pokryta była zaadsorbowanymi molekułami NaC. W przypadku braku powinowactwa analitu zarówno do micelarnej fazy ruchomej jak modyfikowanej fazy stacjonarnej, należałoby spodziewać się wymywania izomerów BNDHP w objętości substancji nie zatrzymywanej na kolumnie. Uzyskane wyniki doświadczalne tego nie potwierdzają ( $k > 0$ ). Sugerują natomiast, że pomimo takiego samego ładunku na analicie i surfaktancie, dzięki oddziaływaniom o charakterze hydrofobowym molekuly BNDHP oddziałują z micelami NaC.

#### 4. Podsumowanie (Conclusions)

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono m.in., że:

1. Adsorpcja soli sodowych kwasów cholowych na fazie C18 przebiega w podobny sposób jak w układach klasycznych liniowych surfaktantów. Na ilość zaadsorbowanego surfaktantu istotny wpływ ma stężenie i rodzaj modyfikatora organicznego. Dodatek rozpuszczalnika organicznego zmniejsza ilość zaadsorbowanego amfifila na fazie stacjonarnej.
2. Badane izomery cząsteczek modelowych oddziałują w fazie ruchomej z micelami cholanu i deoksycholanu sodu.
3. Wzrost długości łańcucha węglowego w dodatku organicznym wpływa na przesunięcie równowagi procesu rozdzielania w kierunku micelarnej fazy ruchomej.
4. Dodatek organiczny w istotny sposób wpływa na zdolność rozpoznania chiralnego przez cząsteczki cholanu sodu. Im dłuższy łańcuch węglowy dodatku n-alkoholu, tym większa jest zdolność układu do enancjoseparacji cząsteczek BNDHP.
5. W odróżnieniu od zjonizowanych izomerów BNDHP, proces rozpoznania chiralnego obojętnych molekuł BN w układzie NaC zachodzi głównie na modyfikowanej surfaktantem fazie stacjonarnej
6. Dodatek modyfikatora organicznego do faz z NaDC ma mniejszy wpływ na proces oddziaływania pomiędzy analitem a micelą niż w układzie z NaC.  
Wzrost stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej wpływa na przesunięcie równowagi w kierunku fazy micelarnej lub fazy wodno-organiczej. Kierunek procesu ściśle zależy od natury i stężenia dodatku w fazie (dokładniej: stosunku liczby moli alkoholu do liczby moli amfifila). Zbyt duże stężenia modyfikatora prowadzi do deagregacji układu micelnego i zaniku zdolności rozpoznania chiralnego w stosunku do badanych molekuł.
7. Micele mniej polarnego deoksycholanu sodu są lepszymi selektorami chiralnymi dla cząsteczek BNDHP. Dla cząsteczek BN lepszymi selektorami okazują się być micide cholanu sodu.

## Literatura (Literature)

1. D.W. Armstrong, S.J. Henry, *Use of an aqueous micellar mobile phase for separation of phenols and polynuclear aromatic hydrocarbons via HPLC*, J. Liq. Chromatogr., **3**(1980)657.
2. A. Berthod, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, *Micellar liquid chromatography*, Marcel Dekker: New York 2000.
3. M.A. Garcia, M. L. Marina, *Micellar liquid chromatography*, in: *Encyclopedia of separation science. Level II. Methods and instrumentation*, Elsevier, 2000, 729.
4. R.W. Williams, Z. S. Fu, W.L. Hinze, *Micellar bile salt mobile phases for the liquid chromatographic separation of routine compounds and optical, geometrical, and structural isomers*, J. Chromatogr. Sci., **28**(1990)292.
5. W.L. Hinze, R.W. Williams, Z.S. Fu, Y. Suzuki, F.H. Quina, *Novel chiral separation techniques based on surfactants*, Colloids and Surface, **48**(1990)79.
6. M.L. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp, W.C. Hamlin, *Investigations of stationary phase modification by the mobile phase surfactant in micellar liquid chromatography*, Anal. Chem., **61**(1989)1353.
7. M.L. Borgerding, R.W. Williams, W.L. Hinze, F.H. Quina, *New perspectives in micellar liquid chromatography*, J. Liq. Chromatogr., **1989**, 12, 1367-1406.
8. A. Bielejewska, R. Nowakowski, K. Duszczyk, D. Sybilska, *Joint use of cyclodextrin additives in chiral discrimination by reversed-phase high-performance liquid chromatography: temperature effects*, J. Chromatogr. A, **840**(1999)159.
9. J.G. Clothier, L.M. Daley, S.A. Tomellini, *Effects of bile salt structure on chiral separations with mixed micelles of bile salts and polyoxyethylene ethers using micellar electrokinetic capillary chromatography*, J. Chromatogr. B, **683**(1996)37.
10. W. Hu, P.R. Haddad, *Adsorption behaviour of zwitterionic surfactants onto a reversed-phase stationary phase*, Chromatographia, **52**(2000)543.
11. A. Berthod, A. Roussel, *The role of the stationary phase in micellar liquid chromatography: Adsorption and efficiency*, J. Chromatogr. A, **449**(1988)349.
12. M.E. Montgomery, Jr. Wirth, M.J. Wirth, *Spectroscopic study of the molecular basis of wetting of a C18 surface by long-chain n-alcohols*, Anal. Chem., **66**(1994)680.
13. N. Mofaddel, H. Krajian, D. Villemin, P.L. Desbene, *Enantioseparation of binaphthol and its mono derivatives by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. A, **1211**(2008)142.

14. A. Mohanty, J. Dey, *Enantioselectivity of vesicle-forming chiral surfactants in capillary electrophoresis: Role of the surfactant headgroup structure*, J. Chromatogr. A, **1128**(2006)259.
15. D.W. Armstrong, F. Nome, *Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography*, Anal. Chem., **53**(1981)1662.
16. D.W. Armstrong, G.Y. Stine, *Selectivity in pseudophase liquid chromatography*, Anal. Chem., **55**(1983)2317.